

흰쥐에 재조합 인간 상피세포 성장인자(DWP401)를 연용피하투여했을 때 약물체내동태

남권호[#] · 조재열 · 정주영 · 장우익 · 강진석 · 유은숙 · 박승국 · 유영효 · 박명환 · 심창구*

(주) 대웅제약 중앙연구소, *서울대학교 약학대학

(Received May 23, 1996)

Pharmacokinetics of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (DWP401) after Repeated Subcutaneous Administration to Rats

Kweon Ho Nam[#], Jae Youl Cho, Joo Young Chung, Woo Ik Chang, Jin Seok Kang, Eun Sook Yoo, Seung Kook Park, Young Hyo Yu, Myung Hwan Park and Chang Koo Shim*

R & D Center, Daewoong Pharm. Co. Ltd., Sungnam, Kyunggi-Do 462-120, Korea

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—The organ distribution and pharmacokinetics of DWP401, a recombinant human epidermal growth factor (rhEGF), were compared after single and repeated subcutaneous administration (50 µg/kg, 10 µCi/kg of ¹²⁵I-DWP401, twice a day for 7 consecutive days) to rats. The pharmacokinetic parameters such as AUC and terminal half-life were similar between two different administration. During repeated administration, the plasma concentration of DWP401 seemed to be constant when the plasma was collected at 15 min after each dosing. The TCA-precipitated radioactivities in thyroid, liver, kidney, and stomach were higher than those of other organs studied after both single and repeated administration. The TCA-precipitated radioactivities after repeated administration in several organs, such as thyroid, stomach, prostate, adrenal, eye ball, and testis were higher than those after single administration. But, according to the observations using gel filtration chromatography and antibody binding assay, the radioactivities in thyroid and stomach were not primarily due to the intact DWP401 or its metabolites but due to the ¹²⁵I-thyroxine binding protein. In conclusion, it can be suggested that DWP401 is metabolized to each amino acid or small polypeptides, and there was no significant changes in pharmacokinetics or any indications for accumulation of DWP401 in rat plasma and organs after repeated treatment.

Keywords □ Pharmacokinetics, DWP401, rhEGF, multiple dose, organ distribution, accumulation.

인간 상피세포 성장 인자 (human epidermal growth factor, hEGF)는 53개의 아미노산으로 구성되어 있고 3개의 이황화 결합을 가지는 분자량 약 6000의 단백질^{1~3)}로서 포유류 세포 특히 상피 및 피부 세포의 성장에 유효한 작용을 나타내어 상처 및 화상 등의 손상된 피부의 재생에 유용한 물질^{4~7)}로 알려져 있다. 또한, hEGF

는 위산 생성의 억제 및 레이 조직의 재생 효과가 탁월하여 위·십이지장 레이치료에 관한 연구⁸⁾가 많이 발표되어 있다. 1986년 최초로 마우스의 악하선에서 얻은 EGF가 각막손상 치료를 위한 점안액으로 개발되었고, 1992년에 사람의 소변에서 얻은 hEGF가 위·십이지장 레이치료 용도로 개발되었다. 그러나 천연물에서 추출한 EGF는 많은 양을 확보할 수 없고, 다양한 분해 산물이 혼입되는 문제로 인하여 고순도 및 일정한 품질을 확보하기에는 어려움이 있다. 최근에 (주) 대웅제약 중앙 연

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

구소에서는 유전자 재조합 기법을 이용하여 고수율의 recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) 발현균주를 개발하였으며, 현재, 이로부터 얻어진 rhEGF를 상처치료 및 각막재생 등의 용도로 개발 진행중에 있다.

Murakami 등의 보고^{9,10)}에 의하면, 흰쥐에 hEGF를 50 µg/kg 이하의 용량으로 단회 정맥 투여했을 때는 전신 클리어란스가 크고 이때는 간 외 클리어란스의 기여도가 작아 전신 클리어란스는 주로 간혈류량에 의해 영향받게 된다. 그러나 100 µg/kg 이상의 투여 용량에서는 조직중에서 hEGF receptor 수가 줄어들어 조직중으로의 hEGF 이행이 포화되며, 이에 따라 전신 클리어란스가 낮아지고 간 외 클리어란스가 차지하는 비중이 커지게 된다. 이와같이 hEGF는 투여량의 증가에 따라 hEGF receptor가 down-regulation되어 조직중으로의 uptake가 포화되고, 이에따라 전신 클리어란스가 감소되고 혈중반감기가 증가하는 용량의존성을 보인다. 이와같이 고용량의 hEGF를 투여할 경우를 제외하고 hEGF는 대부분이 신속한 대사과정으로 인해 소실되는 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹⁶⁾ 그러나 연용투여시에는 50 µg/kg 이하의 소량을 투여하더라도 체내에 hEGF의 빈번한 노출로 인하여 단회 투여와는 달리 hEGF receptor 수의 변화에 영향을 미칠 가능성¹⁷⁾을 무시할 수 없으며, 이에따라 약물의 체내동태가 달라져 약효나 안전성에 예기치 못한 변화가 일어날 가능성도 배제할 수 없다. 그러므로 본연구에서는 ¹²⁵I-DWP401 또는 비표지 DWP401을 흰쥐에 1주일간 피하주사한 후, 혈중 농도 및 조직 분포로부터 체내 축적성의 여부를 알아보고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기 - ¹²⁵I-DWP401은 (주) 대웅제약 중앙 연구소에서 순도 99% 이상 (HPLC)으로 정제 제조한 DWP401에 N-chloro-benzensulfonamide sodium salt (Pierce Co., Rockford, IL, USA)를 이용한 iodination 방법을 이용하여 표지하였다. DWP401에 결합되지 않은 ¹²⁵I-Na는 Sephadex G-25 column (Pierce Co.)으로 제거하였다. ¹²⁵I-DWP401의 비방사능 (specific activity)은 약 2~6 µCi/nmol 이었고, gel filtration chromatography (GFC) 결과 순도 96% 이상, 그리고 15% trichloroacetic acid (TCA)에 의한 침전

결과 순도 95% 이상을 나타내었다. 기타시약은 특급시약을 사용하였다. 기기로는 방사능 측정장치인 γ -counter (Packard Cobra II, Canberra Co., Meriden, CT, USA), 원심분리기 (Beckmann Microfuge 11, Fullerton, Cal, USA, Jouan CR 422, Jouan MR 1822, Cedex, France), homogenizer (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) 및 gel filtration chromatography (Pharmacia FPLC[®] system, Uppsala, Sweden) 등을 사용하였다.

실험동물 및 사육조건 - Sprague-Dawley계 흰쥐 숫컷 (5~6 주령, Charls River, Atsugi, Japan)을 1주 이상 순화시킨 체중 200~250 g 범위의 것을 사용하였다. 동물실내의 명암은 12시간으로 자동 조절시켰으며 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

동물실험군 - 흰쥐를 비표지 및 표지 ¹²⁵I-DWP401 투여군의 두군으로 임의로 나누어 각각에 대하여 단회 및 연용 투여를 실시하였다. ¹²⁵I-DWP401 투여군에 대해서는 혈액, 혈장 및 조직중 방사활성을 측정하였고, 비표지 DWP401에 대해서는 혈장중 농도를 측정하였다.

투여 약액의 제조 및 약물의 투여 - DWP401을 주 사용 생리식염수에 녹여 1 ml에 DWP401이 25 µg 함유되도록 조제하고 이를 비표지 DWP401 투여 약액으로 하였다. 또 DWP401 용액에 ¹²⁵I-DWP401 원액 일정량을 가하여 약 5 µCi/25 µg/ml의 농도가 되도록 하고 이를 ¹²⁵I-DWP401 투여 약액으로 하였다. 흰쥐를 비표지 DWP401 투여군과 표지 ¹²⁵I-DWP401 투여군으로 나누어 상기의 두가지 약액을 흰쥐의 체중 kg당 2 ml의 용량으로 각각 단회투여 또는 1일 2회(오전 9시, 오후 4시), 7일간 연속적으로 피하주사하였다.

혈액의 채취 및 처리 - 실험에 사용된 모든 동물은 실험전 16시간 이상을 절식시켰고 체중을 측정한 다음 수술을 실시하였다. 흰쥐를 배위고정한 후 에테르로 가볍게 마취시키고 좌측 대퇴동맥 정맥에 폴리에틸렌관 (PE-50, Intramedic[®], Clay Adams, Parsippany, NJ, USA)을 삽입하고 절개부위를 봉합하였다. 흰쥐가 마취에서 깨어나도록 충분히 방치한 다음 ¹²⁵I-DWP401을 단회피하주사하였다. 약물을 투여한 후, 5, 10, 15, 및 30 분, 그리고 1, 2, 및 3 시간에 좌측대퇴동맥으로부터 혈액 약 200 µl를 채취하였다. 혈액 채취 직후에 생리식염수 200 µl를 정맥을 통하여 보충하여 주었고,

heparinized saline (20 IU/ml)으로 폴리에틸렌관내의 혈액 응고를 방지하였다. 혈액중 방사능을 측정하고, 이 혈액을 12,000 rpm에서 2분간 원심분리 후 혈장중의 방사능을 측정하였다. 또 이 혈장에 10배의 15% TCA를 가한 후 원심분리 (12,000 rpm, 5분)하여 얻은 침전분획중의 방사능을 측정하였다. 흰쥐에 ^{125}I -DWP 401을 7일간 연용투여하고, 혈액 및 혈장중 방사능농도를 경시적으로 측정하기 위하여, 연속피하주사 기간중에는 1일부터 6일까지 매일 두번째 투여 후 15분에 꼬리 동맥으로부터 채혈하여 미리 100 IU/ml의 heparin 20 μl 를 가한 튜브에 채취하였다. 7일간 연속 피하주사하고 마지막투여 후에는 흰쥐를 배우고정하여 위의 단회투여시와 같은 방법으로 혈액을 채취하고 방사능활성을 측정하였다. 흰쥐에 비표지 DWP401을 단회 또는 7일간 연용투여하고 혈장중 DWP401의 농도를 경시적으로 측정하기 위하여, DWP401을 위와 동일하게 단회 및 7일간 연속피하주사 후, 같은 시간에 채혈하여 혈장을 분리하고 정량시까지 -70°C 에 보관한 후, 방사면역측정법 (radioimmunoassay, RIA)으로 혈장중 DWP401의 농도를 측정하였다.

조직분포 - 흰쥐에 ^{125}I -DWP401을 단회 및 7일간 연속 피하 주사한 후, 15분 및 3시간에 에테르 마취하에서, 복부 대동맥으로부터 전혈을 채취하여 흰쥐를 치사시키고 상기의 방법에 따라 혈액, 혈장 및 혈장의 TCA 침전분획중에서의 방사능활성을 측정하였다. 채취한 혈장의 일부는 antibody binding assay (ABA) 및 gel filtration chromatography (GFC)용으로 따로 -70°C 에서 보관하였다. 채혈 후 즉시 차가운 생리식염수 30 ml를 간문맥을 통하여 관류해서 충분히 방혈하고 liver, small intestine, large intestine, testis, stomach, kidney, brain, appendix, muscle, skin, spleen, thymus, lung, heart, bone, eye ball, adrenal, prostate 및 thyroid 등을 적출하였다. 적출한 장기는 생리식염수로 가볍게 세척하고 여지에 물기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 이어서 전체 장기에 2배 부피의 0.05% Tween 80을 함유한 인산완충액 (pH 7.5, PBS-Tween)을 가하여 tissue homogenizer로 균질화시킨 후¹⁶⁾, homogenate 일부를 취하여 방사능활성을 측정하고 여기에 3배의 15% TCA를 가하여 원심분리 (3,000 rpm, 15분)한 다음, 침전 분획중의 방사능활성을 측정하였다. TCA 침전법에 의해 측정된 방사능활성치가 미변화 ^{125}I -DWP401를 반영하는 근사치이기

는 하지만, 방사능활성을 지닌 대사체의 영향, 즉 ^{125}I 을 함유한 갑상선호르몬이나 ^{125}I 와 결합한 단백질의 영향을 배제하기 어려운 단점이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 몇가지 장기에 대하여 TCA를 가하지 않은 일부 균질화액을 원심분리하여 얻은 상정액과 상기의 혈장에 대해 GFC를 행하여 방사능활성을 가진 주대사체로 알려진 ^{125}I -tyrosine, 이것과 결합한 단백질 및 미변화 ^{125}I -DWP401과의 분리를 시도하였다. 이결과, 미변화 ^{125}I -DWP401과 ^{125}I -tyrosine에 결합한 단백질이 분리되지 않았으므로, ABA를 이용하여 미변화 DWP401인지, 아닌지의 여부를 판별하고자 하였다.

Radioimmunoassay (RIA) - 혈장중 DWP401의 농도는 Gregory 등¹⁵⁾이 개발한 RIA방법을 이용하여 측정하였다. 혈장시료를 검량선의 범위에 들도록 적절히 희석하고 200 μl 를 취한 후 100,000 : 1로 희석한 anti-DWP401 polyclonal antiserum 100 μl 와 약하게 혼합하였다. 이 혼합물을 2시간동안 37°C , incubator에서 반응시키고 100 μl 의 ^{125}I -DWP401 (10,000 cpm)와 잘 섞은 다음, 4°C 에서 18시간 동안 반응시켰다. 형성된 항체와 항원(DWP401)복합체를 미반응한 항원과 분리시키기 위해서 PEG 침전법을 변형하여 사용하였다. 즉, 시료에 100 μl 의 normal rabbit serum (20 : 1 희석), 200 μl 의 anti-rabbit immunoglobulin goat IgG (100 : 1 희석), 500 μl 의 6% polyethylene glycol을 순차적으로 넣어준 다음, 잘 섞어주고 실온에서 30분간 방치시켰다. 이것을 원심분리 (13,000 rpm, 10분) 한 후 침전분획중의 방사능량을 γ -counter를 이용하여 측정한 후 RIA smart program을 이용하여 자동적으로 시료량을 측정하였다. 여기에서 사용한 polyclonal antibody는 흰쥐 EGF 및 혈장단백질과 교차반응이 일어나지 않는 것으로 나타났지만 혈장시료는 최소 2배 이상 희석하여 사용하였다.

Table I—Gel filtration chromatographic conditions

Pump	Pharmacia LKB pump P-500 (Uppsala, Sweden)
Injector	Rheodyne (Cotati, Cal, USA)
Column	Sephadex G-25, 16×400 mm (Pharmacia, Uppsala, Sweden)
Temperature	Ambient
Mobile phase	0.1% Triton X-100, 1-M acetic acid, 1-M urea
Flow rate	0.5 ml/min
Injection volume	200~400 μl
Fraction collector	Pharmacia LKB FRAC-200

Gel filtration chromatography (GFC) - 혈장 및 원심분리한 조직균질액의 상층을 0.45 μm filter로 여과하여 GFC에 주입한 후 매 2분마다 용리액을 분취하고 그 방사능량을 측정하여 chromatogram을 작성하였다. GFC 조건은 Table I과 같다.

Antibody binding assay (ABA) - 채취한 혈장 및 원심분리한 조직균질화액의 상층액 각 200 μl에 대응제약에서 제조한 DWP401의 polyclonal antibody 100 μl를 넣고 약하게 진탕하면서 1시간 동안 상온에서 incubation하였다. 이어서 100 μl의 Immuno-precipitin (Gibco BRL)을 가하고 다시 30분간 상온에서 incubation한 후 원심분리 (13,000 rpm, 10분)하여 상층액 (A)과 침전 (B)을 따로 분리하고 각각의 방사능량을 측정하였다. 항체결합율은 $\{B/(A+B)\} \times 100$ 으로 계산하였다. Standard ¹²⁵I-DWP401의 회수율은 약 93%였고, 항체를 가하지 않은 경우에 약 6%가 회수되었다. ¹²⁵I와 ¹²⁵I-tyrosine에 대해서도 약 3%의 회수율을 보였다.

데이터의 처리 - 방사능도는 측정치 (cpm)를 DWP401 당량으로 환산하여 ng DWP401/ml로 표시하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준오차로

나타내었으며 unpaired *t*-test로 유의성을 검증하였다.

실험결과

혈중 방사능농도추이 - 흰쥐에 ¹²⁵I-DWP401을 1일 2회 7일간 연속 피하주사시의 매일 두번째투여 후, 15분 시점에서의 혈액, 혈장, 및 혈장 TCA 분획중의 방사능농도추이를 Fig. 1에 나타내었다. 혈액, 혈장, 및 혈장 TCA 분획중 방사능농도는 7일간 일정치를 유지하였다. 또, 단회투여 및 연용투여 종료 후 3시간까지의 혈액, 혈장 및 혈장 TCA 분획중의 방사능농도추이를 Fig. 2에 나타내었다. 단회 및 연용투여시, 혈액과 혈장중 방사능활성은 투여후 15분에 peak를 이루다가 시간에 따라 계속해서 증가하는 경향을 보였으며, 이는 혈액내에서 ¹²⁵I-DWP401로부터 유리된 ¹²⁵I의 영향 때문이라고 생각된다. 그러나 혈장 TCA 분획중 방사능활성은 15분에 peak를 나타내다가 이후로 감소하였다. 혈장에 대해 ABA를 실시했을때, 투여 후 15분 및 3시간 시점에서 연용투여는 단회투여와 유

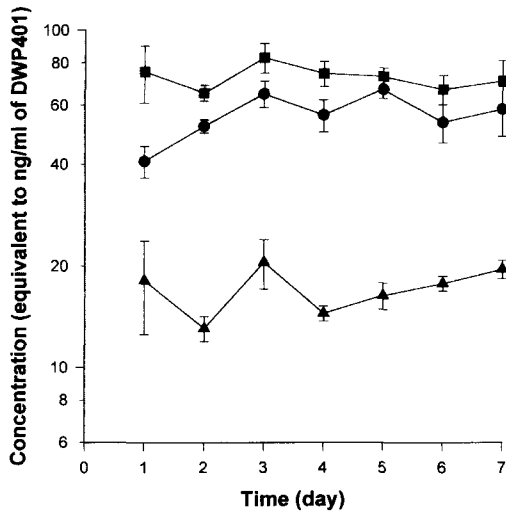


Fig. 1 - Radioactivities (equivalent to ng/ml of DWP401) in the whole blood(●), plasma (■) and TCA precipitated in plasma (▲) at 15 min after each second dosing during daily s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401 (10 μCi/50 μg/kg, twice a day) for 7 consecutive days to rats. Each value represents mean±S.E. of 6 observations.

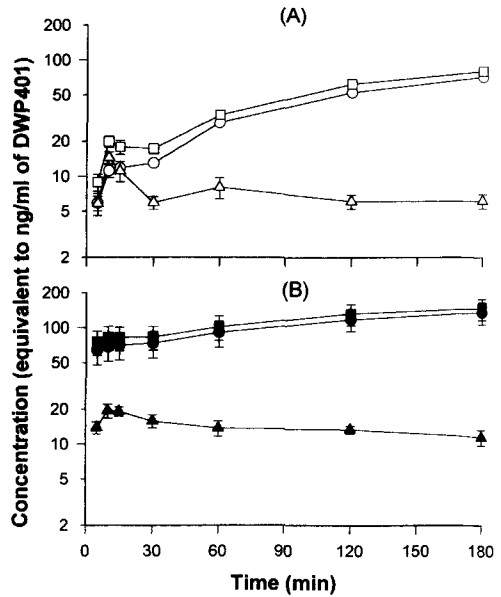


Fig. 2 - Radioactivities in the blood(circle), plasma (rectangle) and TCA precipitated in plasma (triangle) after single (A) or repeated (B) s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401 (10 μCi/50 μg/kg, twice a day) for 7 consecutive days to rats. Each value represents mean±S.E. of 4 observations.

Table II—Antibody binding assay of plasma and tissue homogenate after single or repeated s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401 (10 μCi/50 μg/kg, twice a day) for 7 consecutive days to rats

Organ	Binding %			
	15 min		3 hr	
	Single dose	Repeated dose	Single dose	Repeated dose
Liver	80.0±0.615	47.1±0.875	59.8±2.88	46.3±0.790
Kidney	62.7±0.160	48.4±2.43	33.0±0.415	24.9±1.86
Stomach	54.8±1.90	9.13±0.340	10.3±0.275	6.51±0.0850
Thyroid	NT*	7.16±0.530	NT*	8.80±1.64
Plasma	22.2±0.163	18.1±5.83	10.1±2.92	13.8±3.97

* : Not tested

Each value represents mean±S.E. of 3 observations.

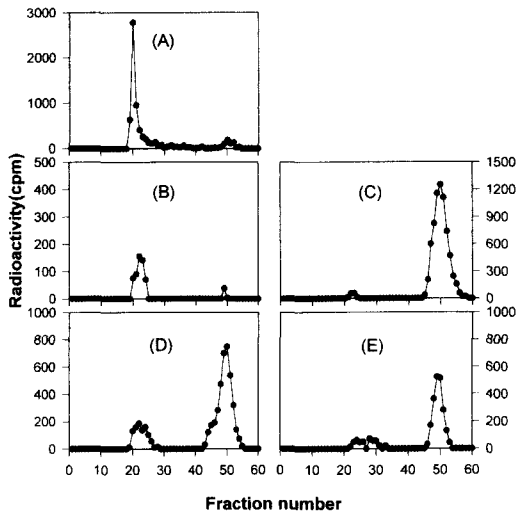


Fig. 3—Gel filtration chromatograms of plasma after single and repeated s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401(10 μCi/50 μg/kg, twice a day) for 7 consecutive days to rats.

(A) : Standard ¹²⁵I-DWP401, (B):Single dose (15 min), (C) : Single dose (3 hr), (D) : Repeated dose (15 min), (E) : Repeated dose (3 hr)

의적인 차이를 보이지 않았다(Table II). 연용투여 종료 후 15분 및 3시간 때의 혈장을 GFC한 결과(Fig. 3), 투여 15분 후의 혈장에서 ¹²⁵I-DWP401과 동일한 fraction에서의 peak 및 그 대사체(¹²⁵I 혹은 ¹²⁵I-tyrosine)^{16,18)}라고 생각되는 peak(No. 50 fraction)가 검출되었으며, 3시간에서는 대사체로 생각되는 fraction에서만 단일 peak가 검출되었다. 이는 단회투여시와 유사한 경향이었다.

혈장중 DWP401의 농도추이 - 혈장중 DWP401의 농도를 RIA 방법으로 정량하였다. DWP401을 상기와 같이 연속투여했을때, 7일간의 농도추이를 Fig. 4에 나

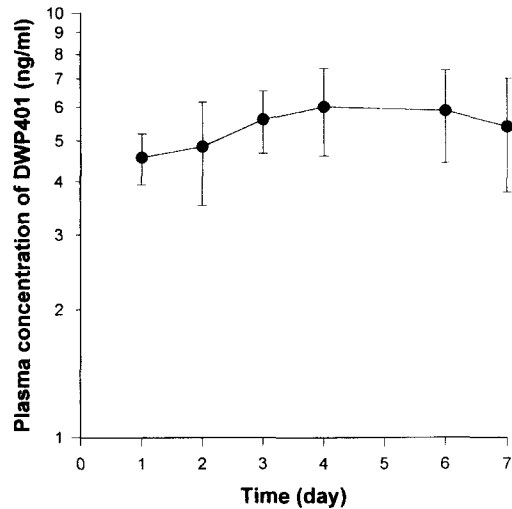


Fig. 4—Plasma concentrations of DWP401 at 15 min after each second dosing during daily s.c. administration of DWP401 (50 μg/kg, twice a day) for 7 consecutive days to rats (determined by radioimmunoassay). Each value represents mean±S.E. of 6 observations.

타내었다. 혈장중 DWP401의 농도는 7일간 일정치를 유지하였다. 또 단회투여 및 연속투여 종료 후 3시간까지의 혈장중 농도추이 및 약물동력학적 파라메타를 Fig. 5에 나타내었다. 혈장중의 농도, AUC 및 걸보기 소실반감기는 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

조직분포 - 흰쥐에 ¹²⁵I-DWP401을 단회투여 및 1일 2회 7일간 연속피하주사한 후 15분 및 3시간에서의 조직중 총 방사능 농도를 Table III 및 IV에 나타내었다. 단회, 연속투여 모두 15분보다 3시간에 대부분의 조직에서 방사능활성이 증가하였고 연속투여에 의해서 방사능활성의 증가를 보였다. 특히 갑상선의 경우 15분 및 3시간에 단회투여시보다 각각 약 1,300 및

54배의 증가치를 보였다. TCA 침전분획중의 방사능 활성을 측정된 결과(Table III 및 IV), 반복투여 15분

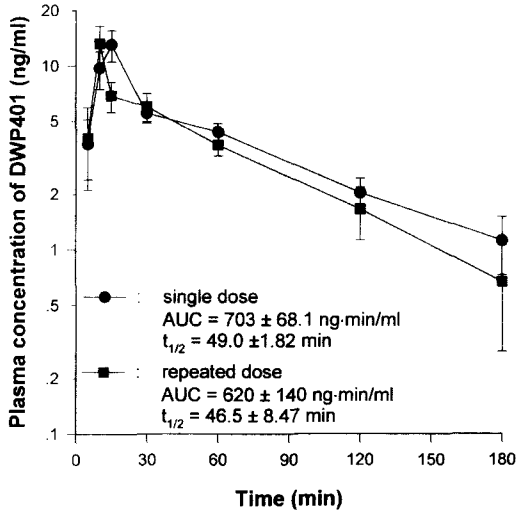


Fig. 5 — Plasma concentrations of DWP401 after single or repeated s.c. administration of DWP401 (50 μ g/kg, twice a day) for 7 consecutive days to rats (determined by radioimmunoassay). Each value represents mean \pm S.E. of 3 observations.

후에는 대부분의 조직에서 단회투여시보다 방사능 활성이 증가하였다. 그러나 혈중에서 DWP401이 거의 검출되지 않은 투여 후 3시간에서는 testis, eye ball, adrenal, 및 prostate 등 비교적 혈류가 적은 장기를 제외하고는 단회투여와 거의 비슷한 농도를 보였다. 갑상선의 TCA 침전분획중 방사능 활성은 반복투여시 15 분 및 3시간에 단회투여 보다 각각 약 2,700 및 80배의 증가치를 보였다. Liver, kidney, stomach, 및 thyroid의 homogenate 상정액을 GFC한 결과 (Figs. 6~8), 연속투여 후 3시간의 stomach에서 ¹²⁵I-DWP401 fraction 근처의 peak가 확인되었으며, thyroid의 경우는 연속투여 후 15분 및 3시간에서 방사능량의 대부분이 ¹²⁵I-DWP401 fraction 부근에서 확인되었다. Liver와 kidney의 경우, 단회 및 연속투여 후 15분 및 3시간 시료 모두에서 ¹²⁵I-DWP401 fraction 이후 (No. 18~29 fraction)에 peak가 확인되었다. 상기의 조직상정액으로 ABA를 실시한 결과 (Table II), stomach와 thyroid에서의 binding 값은 매우 낮게 측정되어 GFC에서의 peak가 미변화 ¹²⁵I-DWP401을 반영하는 것이 아니라 이의 대사체인

Table III — Distribution of total radioactivity and TCA precipitated in tissues at 15 min and 3 hr after single s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401 (10 μ Ci/50 μ g/kg) to rats

Organ	Concentration (ng eq. to DWP401 per g tissue or ml blood and plasma)			
	15 min		3 hr	
	Total	TCA precipitated	Total	TCA precipitated
Liver	91.5 \pm 7.38	70.3 \pm 6.71	76.1 \pm 11.0	45.9 \pm 5.94
Small intestine	11.3 \pm 0.631	6.84 \pm 0.379	29.6 \pm 0.627	9.72 \pm 0.444
Large intestine	8.37 \pm 0.0781	6.02 \pm 0.0240	24.4 \pm 1.12	12.7 \pm 0.501
Testis	0.870 \pm 0.159	0.0930 \pm 0.0930	13.8 \pm 0.627	1.25 \pm 0.180
Stomach	11.0 \pm 0.934	5.23 \pm 0.489	97.0 \pm 9.78	16.6 \pm 1.50
Kidney	62.9 \pm 5.41	34.3 \pm 4.96	93.6 \pm 4.08	30.9 \pm 2.86
Brain	3.06 \pm 2.22	2.14 \pm 1.77	3.94 \pm 0.401	0.597 \pm 0.208
Appendix	18.8 \pm 10.1	14.6 \pm 8.41	22.3 \pm 1.07	6.73 \pm 0.357
Muscle	0.960 \pm 0.0889	0.443 \pm 0.187	8.71 \pm 0.653	1.71 \pm 0.416
Skin	33.1 \pm 14.3	—	71.1 \pm 5.90	—
Spleen	4.70 \pm 0.573	2.66 \pm 0.249	21.2 \pm 1.32	4.09 \pm 0.445
Thymus	2.11 \pm 0.165	0.903 \pm 0.231	21.0 \pm 1.89	3.64 \pm 0.469
Lung	6.66 \pm 2.25	3.30 \pm 0.863	27.3 \pm 2.28	6.56 \pm 0.624
Heart	7.42 \pm 3.66	2.51 \pm 0.417	15.6 \pm 0.876	3.18 \pm 0.259
Bone	16.3 \pm 5.09	—	23.0 \pm 0.710	—
Eye ball	1.27 \pm 0.338	0.473 \pm 0.335	11.5 \pm 1.05	0.857 \pm 0.389
Adrenal	2.71 \pm 2.06	1.17 \pm 1.17	27.8 \pm 2.40	1.48 \pm 1.48
Prostate	4.41 \pm 0.422	1.73 \pm 0.586	24.8 \pm 1.71	1.60 \pm 0.720
Thyroid	7.92 \pm 1.94	2.68 \pm 1.46	190 \pm 93.6	121 \pm 89.2
Blood	9.48 \pm 1.55	—	70.6 \pm 4.14	—
Plasma	15.4 \pm 1.14	10.1 \pm 0.842	78.9 \pm 3.39	6.10 \pm 0.852

* Radioactivity was converted to ng equivalent of DWP401. Each value represent mean \pm S.E. of 3~4 observations.

Table IV — Distribution of total radioactivity and TCA precipitated in tissues at 15 min and 3 hr after repeated daily s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401 (10 μCi/50 μg/kg, twice a day) for 7 consecutive days to rats

Organ	Concentration (ng eq. to DWP401 per g tissue or ml blood and plasma)			
	15 min		3 hr	
	Total	TCA precipitated	Total	TCA precipitated
Liver	117±4.80	80.7±3.40	84.4±20.2	47.5±16.4
Small intestine	29.5±4.58	14.1±0.326	47.8±11.08	10.0±1.26
Large intestine	19.2±3.67	11.6±1.41	35.9±7.43	14.7±0.193
Testis	15.6±5.03	2.26±0.526	36.9±7.42	3.38±0.516
Stomach	137±56.6	19.9±5.59	221±52.0	25.2±5.05
Kidney	125±10.4	62.1±3.95	140±16.1	50.2±4.77
Brain	3.14±0.458	1.61±0.221	5.77±0.900	1.15±0.163
Appendix	20.8±3.25	11.3±1.39	37.6±7.67	8.57±0.825
Muscle	5.71±1.65	1.38±0.355	14.6±3.06	2.41±0.477
Skin	199±42.4	—	298±48.9	—
Spleen	15.6±2.13	3.71±0.360	41.4±12.0	5.03±1.47
Thymus	12.6±2.56	2.79±0.589	39.1±7.29	4.62±0.731
Lung	22.4±3.15	7.88±0.673	38.2±4.14	7.44±1.15
Heart	12.6±2.18	4.60±0.536	20.7±3.55	3.09±0.492
Bone	18.7±4.96	—	41.0±7.86	—
Eye ball	7.52±0.425	2.26±0.465	28.9±9.01	2.85±2.07
Adrenal	36.5±13.4	12.2±4.27	67.7±23.0	8.83±6.65
Prostate	20.8±4.41	5.15±0.619	57.0±13.3	5.17±1.35
Thyroid	10200±3270	7280±2850	10400±5730	9500±5560
Blood	49.0±6.79	—	135±29.2	—
Plasma	61.9±8.16	19.9±1.933	146±30.2	11.4±1.73

* Radioactivity was converted to ng equivalent of DWP401. Each value represents mean ± S.E. of 3~4 observations.

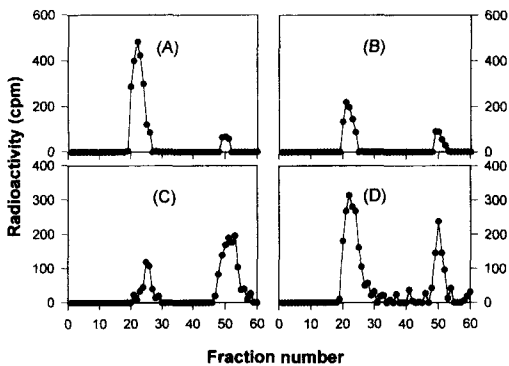


Fig. 6 — Gel filtration chromatograms of liver homogenates after single and repeated s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401 (10 μCi/50 μg/kg) for 7 consecutive days to rats. (A) : Single dose, 15 min, (B) : Single dose, 3 hr, (C) : Repeated dose, 15 min, (D) : Repeated dose 3 hr.

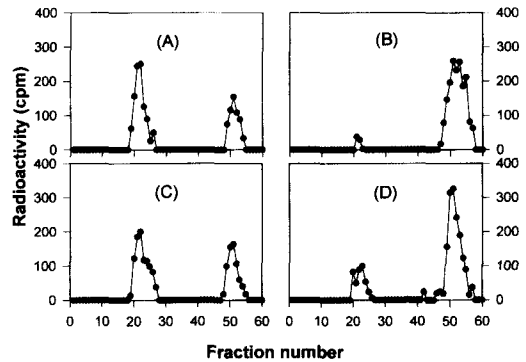


Fig. 7 — Gel filtration chromatograms of kidney homogenates after single and repeated s.c. administration of ¹²⁵I-DWP401 (10 μCi/50 μg/kg) for 7 consecutive days to rats. (A) : Single dose, 15 min, (B) : Single dose, 3 hr, (C) : Repeated dose, 15 min, (D) : Repeated dose, 3 hr.

¹²⁵I-tyrosine과 binding protein과의 결합에 의한 것임을 시사한다. 반면에 liver와 kidney 시료중에서는 binding 치가 높게 측정되어 미변화 ¹²⁵I-DWP401 혹은 이의 방사활성을 갖는 대사체에 의한 영향으로 생

각되나, 단회와 연용투여시 모두 같은 경향을 보였으므로 축적성과는 무관한 것으로 사료된다. ABA 실험 결과, 조직시료중 단회투여시의 binding 치가 연용투여시보다 높게 나오는 것은 체내에 축적된 ¹²⁵I나 ¹²⁵I-

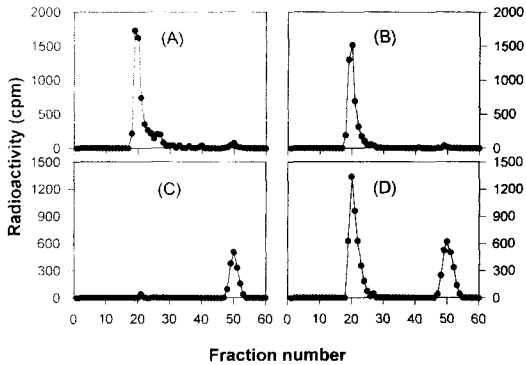


Fig. 8 Gel filtration chromatograms of thyroid and stomach homogenates after s.c. administration of ^{125}I -DWP401 (10 $\mu\text{Ci}/50 \mu\text{g}/\text{kg}$, twice a day) for 7 consecutive days to rats.

(A) : Thyroid, 15 min. (B) : Thyroid, 3 hr. (C) : Stomach, 15 min. (D) : Stomach, 3 hr

tyrosine의 분율이 연용투여에 의해 상대적으로 높아 지기 때문인 것으로 생각된다.

고 찰

원취에 표지 ^{125}I -DWP401 및 비표지 DWP401을 1일 2회 7일간 연속 피하주사하여 혈중농도 및 조직분포를 측정하여 이로부터 DWP401의 체내축적성 여부를 검토하였다.

DWP401과 같은 대부분의 단백질 의약품에 대한 조직분포 및 체내축적성을 검토하는 경우, 조직중의 정량성을 확보하는 것이 중요하다. 그러나 가장 많이 이용하고 있는 immunoassay 방법이 혈중농도 측정시는 가능하지만, 조직중에서는 biological matrix의 영향때문에 추출과정이 까다롭고 batch processing을 요하는 약물동력학적 연구에는 현실적으로 어려움이 많으므로 ^{125}I 등의 방사선 동위원소를 표지하여 평가하는 것이 일반이지만, 이러한 경우에도 유리된 ^{125}I 또는 ^{125}I -tyrosine에 대한 영향을 충분히 고려하여야 한다.¹⁸⁾ 예컨대 생체내에 부여된 표지 단백질로부터 ^{125}I 또는 ^{125}I -tyrosine이 유리되어 주로 갑상선으로 집적되고, 여기에서 thyroglobulin의 형태로 존재하다가 갑상선호르몬인 thyroxine 또는 triiodothyronine으로 혈액중에 분비된다. 혈액중에서의 갑상선호르몬은 대부분 thyroxine binding globulin (TBG) 또는 thyroxine binding prealbumin (TBPA)과 결합하여 존재하는

것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 따라서 표지화합물로부터 ^{125}I 또는 ^{125}I -tyrosine이 유리되면 혈중은 물론 조직중 농도에 (+)오차를 야기하게 된다. 유리된 ^{125}I 의 영향을 막기 위해 실험동물에 NaI를 전처리하여 조직중에 iodine을 미리 포화시키기도 하지만 skin, stomach, 및 intestine 등으로의 ^{125}I uptake를 크게 차단할 수는 없으며, ^{125}I 의 유리를 막기 위해 dehalogenase inhibitor를 사용하기도 하지만 이것 역시 ^{125}I -tyrosine에 의한 영향은 피할 수가 없다고 한다.¹⁸⁾ 이상과 같은 영향들을 충분히 고려하여 DWP401의 체내동태연구를 실시하였고 연용투여에 따른 체내축적성을 검토하였다.

연용 투여시 DWP401의 혈중축적여부를 검토하기 위하여, ^{125}I -DWP401을 연속피하주사한 후 혈액, 혈장, 및 혈장중 TCA 침전분획의 방사능농도를 측정한 결과, 연용투여에 의해 이들중의 혈중방사능활성이 증가하였다. 그러나 이는 표지화합물에서 유리된 ^{125}I 또는 ^{125}I -tyrosine에 기인할 가능성이 크고, 고유한 ^{125}I -DWP401의 농도를 가장 잘 반영하는 TCA 침전분획중의 방사능측정치라 할지라도 thyroxine binding protein 등에 대한 영향을 고려해야 하므로 정확한 DWP401의 체내동태를 반영하기는 어렵다고 생각된다. 따라서 ^{125}I 이 표지되지 않은 DWP401을 연용투여하여 단회투여와 비교하였더니, Fig. 2와는 달리 혈장중농도와 약물동력학적 파라메타에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 5). GFC 결과 (Fig. 3), 시간이 경과함에 따라 ^{125}I -DWP401의 대사체라고 생각되는 peak가 커지고 있는 사실은 이와같은 추론, 즉 연용투여에 의한 방사능활성의 증가는 ^{125}I -DWP401에 의한 것이 아니라 유리된 ^{125}I 에 기인한 것일 것이라는 추론을 뒷받침한다. 따라서 Fig. 2에서 연용투여시 혈액 및 혈장중 방사능활성이 단회투여시보다 높게 나타난 것은 ^{125}I -DWP401에 의한 것이 아니라 이로부터 유리된 ^{125}I 또는 ^{125}I -tyrosine의 축적에 기인할 가능성이 시사되었다. 실제로 혈장중 TCA 침전분획중 방사능활성 및 DWP401의 polyclonal antibody를 이용한 ABA법으로 결합분율을 측정한 결과 (Table II), 혈액과 혈장중의 측정치에 비해 현저한 감소를 보였다.

조직중 DWP401의 축적성을 알아보기 위하여 ^{125}I -DWP401을 1일 2회 7일간 연속피하주사하였고 마지막 투여 후 15분, 3시간에 각 조직을 적출하였다. 이어서 적출한 조직을 균질화하여 조직중 총방사능량, TCA 침

전분획중의 방사능량을 측정하고 이를 단회투여시와 비교하였다(Table III 및 IV). 또 이들중 몇가지 장기, 즉 liver, kidney, stomach, 및 thyroid의 원심분리 상정액을 GFC하여 ^{125}I -DWP401과 그 대사체의 분리를 시도하였고 (Figs. 6~8) 더불어 ABA를 실시하였다 (Table II). 연용투여에 의해 거의 모든 조직에서 조직중 총방사능량이 단회투여에 비해 증가하였으나, 몇가지 장기를 제외하고 혈중에서 DWP401이 거의 검출되지 않은 마지막 투여 후 3시간에서의 TCA 침전분획중 방사능량을 측정한 결과, 조직축적성이 인정되지 않았다. 특히 testis, eye ball, adrenal, 및 prostate 등의 혈행이 풍부하지 못한 장기에서는 방사능량의 증가로 잔류성이 인정되었으나 방사활성치가 낮아 GFC와 ABA에 의한 평가가 불가능하였으며, 이것이 실제 ^{125}I -DWP401의 농도를 반영하는 것인지에 대해서는 좀더 정확한 정량법의 개발이 필요하리라 생각된다. 연용투여 후 3시간에서의 stomach 시료를 GFC한 결과 (Fig. 8), ^{125}I -DWP401 fraction 근처 (fraction No. 20)의 peak가 확인되었다. 그러나 Table II의 ABA의 결과에서 fraction No. 20의 peak는 DWP401이 아니라 thyroxine binding protein 등에 의한 것일 가능성이 시사된다. 갑상선은 단회투여시에도 방사능의 잔류성이 인정되었고 연용투여함으로써 더욱 축적되었다. 또 GFC에 의한 분석 결과 fraction No. 20 부근에서 peak가 나타났다. 이로부터 연용투여에 의해 미변화 DWP401가 갑상선에 축적되는 것으로 생각하기 쉬우나 Table II의 ABA의 결과에서 연용투여시 갑상선에서의 binding %가 낮은 사실로 미루어 fraction No. 20은 미변화 DWP401이 아니라 갑상선에서 iodine의 저장형인 thyroglobulin으로부터 기인할 가능성이 크다고 생각된다. Liver와 kidney 시료를 GFC한 경우 (Figs. 6 및 7), 단회 및 연속투여후 15분 및 3시간 시료 모두에서 ^{125}I -DWP401 fraction 이후 (fraction No. 18~29)에 peak가 확인되었다. 또, ABA를 실시한 결과 (Table II), liver와 kidney 시료중에서는 binding %가 높게 측정되어 미변화 ^{125}I -DWP401 혹은 이의 방사활성을 갖는 대사체에 의한 영향으로 생각된다. GFC의 결과로 미루어 보아 liver와 kidney 조직 내에는 DWP401의 비교적 분자량이 큰 대사체가 존재할 것으로 생각되며, 특히, ABA 실험시 polyclonal antibody를 사용하여 binding %를 측정하였으므로 위의 가정을 더욱 더 잘 뒷받침하여 준다. 그러나 이러

한 결과는 단회와 연용투여시 모두 같은 경향을 보였으므로 축적성과는 무관한 것으로 사료된다.

결론적으로, DWP401의 7일간 연용투여에 의해서 혈중농도추이 및 약물동력학적 파라메타는 단회투여시와 비하여 유의적인 차이가 없었으며, 대부분의 장기에서 미변화 DWP401로서의 축적성은 관찰되지 않았다. 그러나 이후로 liver와 kidney에서 비교적 분자량이 큰 DWP401의 대사체로 의심되는 존재의 여부 및 축적이 곤란한 일부 장기에서의 연구가 필요하리라 생각되며, 이를 위해 조직중 단백질 의약품의 정량법등에 관한 심도 깊은 연구가 수행되어야 할 것이다.

문 헌

- 1) Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* **237**, 1555 (1962).
- 2) Savage, C. R., Hash, J. H. and Cohen, S. : Epidermal growth factor location of disulfide bond. *J. Biol. Chem.* **248**, 7669 (1973).
- 3) Savage, C. R., Inagami, T. and Cohen, S. : The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **247**, 7612 (1972).
- 4) Cohen, S. and Elliot, G. A. : The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J. Invest. Dermatol.* **40**, 1 (1963).
- 5) Niall, M., Ryan, G. B. and O'Brien, B. M. : The effect of epidermal growth factor on wound healing in mice. *J. Sug. Res.* **33**, 164 (1982).
- 6) Brown, G. L., Nanney, L. B., Griffen, J., Cramer, A. B., Yancey, J. M., Curtsinger, III, L. J., Houtzin, L., Schultz, G. S., Jurkiewicz, M. J. and Lyngh, J. B. : Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N. Engl. J. Med.* **321**, 76 (1989).
- 7) Brown, G. L., Curtsinger, L. I. and Brightwell, J. R. : Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J. Exp. Med.* **163**, 1319 (1986).
- 8) Itoh, M., Joh, T., Imai, S., Miyamoto, T., Matsusako, K., Iwai, A., Katsumi, K., Endo, K. and Takeuchi, T. : Experimental and clinical

- studies on epidermal growth factor for gastric mucosal protection and healing of gastric ulcers. *J. Clin. Gastroenterol.* **10** (suppl. 1), S7 (1988).
- 9) Murakami, T., Kawakita, H., Kishimoto, M., Higashi, Y., Amagase, H., Hayashi, T., Nojima, N., Fuwa, T. and Yata, N. : Intravenous and subcutaneous pharmacokinetics and rectal bioavailability of human epidermal growth factor in the presence of absorption promoter in rats. *Int. J. Pharm.* **46**, 9 (1988).
 - 10) Murakami, T., Misaki, M., Masuda, S., Higashi, Y., Fuwa, T. and Yata, N. : Dose-dependent plasma clearance of human epidermal growth factor in rats. *J. Pharm. Sci.* **83**, 1400 (1994)
 - 11) Hayashi, T., Hashimoto, K. and Sakamoto, S. : A sensitive enzymeimmunoassay for human epidermal growth factor. Determination of hEGF in human serum and urine and pharmacokinetics in mouse. *J. Pharmacobio-Dyn.* **12**, 410 (1989).
 - 12) Kim, D. C., Sugiyama, Y., Satoh, H., Fuwa, T., Iga, T. and Hanano, M. : Kinetic analysis of *in vivo* receptor-dependent binding of human epidermal growth factor by rat tissue. *J. Pharm. Sci.* **77**, 200 (1988).
 - 13) Kim, D. C., Sugiyama, Y., Fuwa, T., Sakamoto, S., Iga, T. and Hanano, M. : Kinetic analysis of the elimination process of human epidermal growth factor (hEGF) in rats. *Biochemical Pharm.* **38**, 241 (1989).
 - 14) Murakami, T., Kishimoto, M., Higashi, Y., Amagase, H., Hayashi, T., Fuwa, T. and Yata, N. : Biliary and urinary excretion of immunoreactive human epidermal growth factor after intravenous administration in rats. *Int. J. Pharm.* **46**, 9 (1988).
 - 15) Gregory, H., Holmes, J. E. and Willshire, I. R. : Urogastrone levels in the urine of normal adult humans. *JCE & M.* **45**, 668 (1977).
 - 16) Iida, S., Iwamoto, M., Suzuki, M., Hisanaga, N. and Komatsu, T. : Metabolic fate of recombinant human tissue plasminogen activator (rt-PA) (2): Blood or plasma concentration, distribution, metabolism, excretion and accumulation in rats after repeated intravenous administration. *Xenobiotic Metab. Dispos.* **3**, 97 (1988).
 - 17) Murakami, T., Kishimoto, M., Higashi, Y., Amagase, H., Fuwa, T. and Yata, N. : Down-regulation and its effect of epidermal growth factor receptor on the pharmacokinetics of human epidermal growth factor after i.v. administration in rats. *Int. J. Pharm.* **54**, 259 (1989).
 - 18) Ferraiolo, B. L., Mohler, M. A. and Gloff, C. A. : Protein pharmacokinetics and metabolism. Plenum press, New York and London, 19 (1992).